

Japanese Patent Application Publication (JP-B) No.61-36177

Publication Date: August 16, 1986

Application No.: 53-68361

Application Date: June 8, 1978

TITLE: HYDROPHILIC SEPARATING CARRIER AND PREPARATION THEREOF

Applicant: Toyo Soda Manufacturing Company, Limited,
Yamaguchi, Japan

Abstract:

A hydrophilic separating carrier is a porous spherical gel having primary hydroxyl groups and is produced by an aqueous suspension homopolymerization of pentaerythritol dimethacrylate or an aqueous suspension copolymerization of pentaerythritol dimethacrylate and a methacrylate monomer having hydrophilic group and/or hydrophilic convertible group.

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

昭61-36177

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 昭和61年(1986)8月16日

G 01 N 30/48
B 01 J 20/22
C 08 F 2/18
20/20
// B 01 D 15/08

A-7621-2G
7106-4G
7102-4J
8319-4J

発明の数 6 (全12頁)

⑮ 発明の名称 親水性分離担体およびその製造方法

⑯ 特 願 昭53-68361

⑰ 公 開 昭54-160300

⑱ 出 願 昭53(1978)6月8日

⑲ 昭54(1979)12月18日

⑳ 発 明 者 佐々木 博 朗 新南陽市大字富田4560番地 東洋曹達工業株式会社内
㉑ 発 明 者 小 宮 克 夫 新南陽市大字富田4560番地 東洋曹達工業株式会社内
㉒ 発 明 者 加 藤 芳 男 新南陽市大字富田4560番地 東洋曹達工業株式会社内
㉓ 出 願 人 東洋曹達工業株式会社 新南陽市大字富田4560番地
㉔ 審 査 官 須 磨 光 夫
㉕ 参 考 文 献 特公 昭48-5794 (JP, B 1)

1

2

㉖ 特許請求の範囲

1 ペンタエリスリトールジメタクリレート単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合により得られる多孔性球状ゲルでかつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有することを特徴とする親水性分離担体。

2 ペンタエリスリトールジメタクリレートのみを、あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとを水と少なくとも2層を形成する有機溶媒およびラジカル重合開始剤の存在下で水性懸濁重合させることを特徴とする多孔性球状ゲルで、かつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有する親水性分離担体の製造方法。

3 ペンタエリスリトールジメタクリレート単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合により得られる多孔性球状ゲルでかつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有するゲルを、アルカリ水溶液中でケン化して得られたものであることを特徴とする親水性分離担体。

4 ペンタエリスリトールジメタクリレートのみをあるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとを水と少なくとも2層を形成する有機溶媒およびラジカル重合開始剤の存在下で水性懸濁重合により得られる多孔性球状ゲルでかつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有するゲルをアルカリ水溶液中でケン化することを特徴とする親水性分離担体の製造方法。

5 ペンタエリスリトールジメタクリレート単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性メタクリレートモノマーおよび/もしくは親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合で得られた多孔性球状ゲルまたは該ゲルをアルカリ水溶液中でケン化して得られる多孔性球状ゲルの第1級水酸基に親水性オキシラン化合物あるいはそのオリゴマーを付加反応により結合させて得られたものであることを特徴とする親水性分離担体。

6 ペンタエリスリトールジメタクリレート単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性メタクリレートモノマーおよび/もしくは親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合で

得られた多孔性球状ゲルまたは該ゲルをアルカリ水溶液中でケン化して得られる多孔性球状ゲルの第1級水酸基に親水性オキシラン化合物あるいはそのオリゴマーを溶媒および触媒の存在下または不存在下に付加反応させることを特徴とする親水性分離担体の製造方法。

発明の詳細な説明

本発明は親水性多孔性球状分離担体およびその製法にかかわるものである。さらに、詳しくは、高速液体クロマトグラフィーにおいて、たんぱく質、酵素などをはじめとする重要な水溶性物質を水溶媒中でゲル浸透効果により分離するために適した親水性分離担体およびその製法にかかわるものである。

従来、水溶性物質を分離精製するための一つの重要な手段としてゲル透過法が知られており、分離担体として、デキストランゲルやポリアクリルアミドゲルなどが生化学分野を中心として広く利用されている。

しかし、これらのゲルは機械的強度が小さく、高速液体クロマトグラフィー用担体としては利用できないという欠点を有している。

最近、アクリレートモノマーやメタクリレートモノマーを架橋重合することにより、機械的強度が大きく親水性のゲルを製造する試みが種々行なわれている。

しかしながら、つぎに示すような重要な性能を十分満足するような高性能のゲルはえられていない。

- (1) 機械的強度が十分大きいこと。
- (2) 被測定物質を吸着しないこと。
- (3) 分離能が大きいこと。

これらの最終性能は理想的なゲルに要求されるきわめて多岐にわたる物理的および化学的性質が兼ね備えられてはじめてえられるものである。

従来、公知のゲルの中で、特公昭48-24512号公報に開示されているポリエチレングリコールジメタクリレートゲルは吸着性が小さいという特徴を有するが、機械的強度および分離能が小さいという欠点を有している。

また、特開昭48-64187号公報に開示されているヒドロキシエチルメタクリレートとエチレングリコールジメタクリレートの共重合によりえられるゲルは吸着性も大きく、機械的強度も小さい。

本発明者らは理想的な親水性分離担体を合成するための重要なポイントは、架橋剤の選択にあるとの考え方から種々の架橋剤について検討を行った。

その結果、従来使用されている架橋剤、たとえばエチレングリコールジメタクリレートの場合には架橋剤に要求される性質のうち、ゲルの機械的強度を増すうえで有効であるが親水性に乏しく、強い疎水性吸着サイトをゲルに与えていることが明らかとなった。

さらに、ペンタエリスリトールジメタクリレートが架橋剤として十分な機械的強度を与えることができるとともに、ゲルを製造したのちにゲル表面に存在する1級の水酸基を基点として親水化処理をほどこすことにより架橋剤の疎水性を打ち消すに十分な親水化ができるため、従来知られている架橋剤を使用した場合に較べて吸着性の点においてきわめてすぐれたゲルが得られることを発見し本発明に到達した。

すなわち、本発明はペンタエリスリトールジメタクリレートのみを重合した、またはペンタエリスリトールジメタクリレートを架橋剤とし親水性メタクリレートモノマーを架橋重合した親水性分離担体、該担体をアルカリ水溶液中でケン化した親水性分離担体および上記二種の担体の細孔表面に存在する1級の水酸基に親水性オキシラン化合物またはそのオリゴマーを付加させた親水性分離担体およびそれらの製法を提供するものである。

本発明のペンタエリスリトールジメタクリレートが架橋剤としてきわめて優れている理由の主たるものは以下の3点である。

- (1) 2個のビニル基の間の鎖が短かく機械的強度の大きなゲルを得ることができる。
- (2) 第1級の水酸基、すなわち、きわめて反応性の高い水酸基を2個有しており、比較的温和な条件下で親水性オキシラン化合物と反応させることができ、親水性の結合鎖により、疎水性部分である重合体の主鎖およびエステル結合を十分に被覆することができる。従つて、疎水性吸着サイトが消滅し、たんぱく質などのきわめて吸着性の強い物質でさえも吸着することなくゲル浸透効果により分子の大ききで分離することが可能になる。
- (3) 水酸基が2個存在し親水性が大きいにもかか

わらず、水性懸濁重合を比較的容易に行うことができる。等であり本発明者らの検討結果によればモノマーあるいは架橋剤の親水性が増すほど水性懸濁重合の安定性が低下し、ペンタエリスリトールジメタクリレートは限界に近い親水性を有しているものである。

以上示した3つの要素はいずれもきわめて重要である。たとえば、(1)の観点からすれば、よく知られた架橋剤であるエチレングリコールジメタクリレートは最も好しい架橋剤であるが、本発明における架橋剤のように反応性の高い水酸基を有しておらず、ゲル化後親水化処理を行うことができないので、強い疎水性吸着サイトを有することになる。

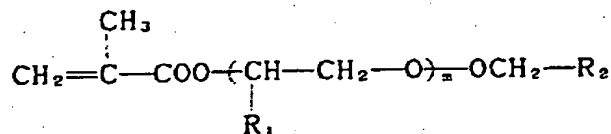
以下、本発明を詳細に説明する。

本発明におけるペンタエリスリトールジメタクリレートは、例えばペンタエリスリトールとグリシジルメタクリレートから簡単に合成可能で、赤外吸収スペクトル、元素分析等の機器および化学分析により、その物理的性質を確認したものを用いるものである。

本発明の第1の親水性分離担体はペンタエリスリトールジメタクリレートの単独またはペンタエリスリトールジメタクリレートとメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合により得られる多孔性球状ゲルで、かつ、該ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有し、その諸物性は、平均粒子径が1~500 μ 、平均細孔径が20~1500 \AA 、保有水量が1~5 g/gを有するものである。

該担体を得る水性懸濁単独重合または共重合は一般にビニルモノマーの懸濁重合においてもいられる公知の方法により行うことができる。たとえば架橋剤、モノマーおよび重合開始剤を通常の有機溶媒に溶解し、40°C~90°C、好ましくは50°C~80°Cで適度の攪拌を行いつつ、懸濁安定剤を含む水中へ添加し、所定の時間架橋重合を行わせる。

架橋剤であるペンタエリスリトールジメタクリレートと共重合モノマーとの比は重量で100:0*



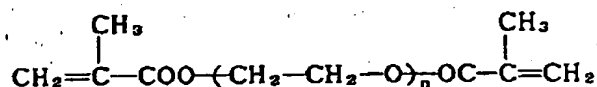
(R_1 はHまたは CH_3 を示し、 R_2 は炭素数3以下の

*から5:95の範囲、好ましくは100:0から10:90の範囲である。

ペンタエリスリトールジメタクリレートの使用割合が大なるほど硬く機械的強度の優れたゲルが得られ、ペンタエリスリトールジメタクリレートのみを重合する場合には特に大なる特徴を有するゲルが得られる。

本発明で用いるメタクリレートモノマーは親水性基を有するメタクリレートモノマーおよび/または親水性基に変性し得るメタクリレートモノマーで、かつ、ペンタエリスリトールジメタクリレートとの水性懸濁共重合が可能であるものを用いるものである。

親水性基を有するメタクリレートモノマーとしては、例えば、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、一般式



(但し、 $3 \leq n \leq 15$)で示されるテトラエチレングリコールジメタクリレート、ノナエチレングリコールジメタクリレートなどの3量体以上のポリエチレングリコールのジメタクリレートなどを挙げることができるが、特に2-ヒドロキシエチルメタクリレートが好ましい。

親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとしては、例えばハロヒドリン類のメタクリレートやオキシラン基を有するメタクリレートモノマーなどを挙げることができるが、特にグリシジルメタクリレートが好ましい。

親水性基および親水性基に変性し得る基の両者を有するメタクリレートモノマーとしては、グリセリン、ペンタエリスリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパンなどの炭素数3ないし6の低級多価アルコールのモノメタクリレート類はそれ自身では親水性が大きすぎて水性懸濁重合を行うことができないが、これらの酢酸プロピオン酸、酪酸等の炭素数4以下の低級飽和脂肪酸エステル類、一般式

$$1 \leq m \leq 15$$

(飽和脂肪族炭化水素残基を示す)で示されるポリ

エチレングリコール類またはポリプロピレングリコール類のモノメタクリレートの末端水酸基に低級飽和脂肪酸をエステル結合させた化合物を挙げることができるが、特にペンタエリスリトールモノメタクリレートのモノもしくはジプロピオネートまたはブチレートが好ましい。

通常の有機溶媒としては、水と少なくとも2層を形成するもので、かつ、架橋剤およびモノマーを溶解する不活性なものであれば用いることができる。たとえば、芳香族炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、炭素数4以上のアルコール類、炭素数4以上のケトン類、脂肪酸エステル類、炭素数5以上のエーテル類などを挙げることができるが、特にトルエン、クロルベンゼン、ジクロルブタン、n-ブタノール、シクロヘキサノール、ジイソブチルケトン、シクロヘキサノン、酢酸n-ブチル、ジイソプロピルエーテルが好ましい。

有機溶媒の使用量は架橋剤とビニルモノマーの合計に対して1~4容量倍、特に1.2~3倍の範囲が好ましい。

重合開始剤としては通常のラジカル重合開始剤を使用することができるが、特に、過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリル、t-ブチルパービバレートなどが好ましい。

重合開始剤の使用量は架橋剤とメタクリレートモノマーの合計に対して0.2~10重量%、特に0.5~5重量%が好ましい。

懸濁安定剤も通常の懸濁安定剤を使用することができるが、特にポバール、ポリビニルピロリドンが好ましい。

該懸濁安定剤の使用量は通常水に対して1~10%の範囲で用いる。

本発明の第2の親水性分離担体はペンタエリスリトールジメタクリレートの単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合により得られる多孔性球状ゲルで、かつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有するゲルをアルカリ水溶液中でケン化してエポキシ基またはハロゲン原子あるいは飽和脂肪酸エステル基が水酸基に変性された親水性分離担体で、その諸物性は、エポキシ基、ハロゲン原子、飽和脂肪酸エステル基の消滅することの他は、平均粒子径、平均細孔

径、保有水量などは第1の親水性分離担体と同様のものである。

該担体を得るためのアルカリ水溶液中でのケン化は、本発明の第1の親水性分離担体を通常のアルカリ性水溶液中に懸濁させ、所定の温度において、適度の攪拌を行いつつ、所定時間ケン化を行なわしめるものである。

アルカリ性水溶液とは、通常用いられるアルカリ金属の水溶液を挙げることができるが、特に、苛性ソーダ、苛性カリ水溶液が好ましい。

本発明の第3の親水性分離担体は、ペンタエリスリトールジメタクリレートの単独水性懸濁重合あるいはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性メタクリレートモノマーおよび/もしくは親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合で得られた多孔性球状ゲルまたは該ゲルをアルカリ水溶液中でケン化して得られる多孔性球状ゲルの第1級水酸基に親水性オキシラン化合物あるいは、そのオリゴマーを付加反応により結合させたもので、その諸物性は第1および第2の親水性分離担体に較べて表面の親水性がさらに向上し、機械的強度の向上がみられ、元素分析値においては、酸素の割合が増加し、赤外吸収スペクトルにおいて、エーテル結合による吸収が増加している他は、平均粒子径、平均細孔径、保有水量などには第1および第2の親水性分離担体と同様のものである。

本発明における親水化処理により得られる効果は、(1)疎水性吸着サイトの被覆による吸着性の改良、(2)架橋効果による機械的強度の増大である。

該担体を得る親水性処理は、本発明の第1または第2の親水性分離担体とオキシラン化合物と触媒および溶媒を混合し、反応温度0~200℃、好ましくは、室温~120℃で、所定の時間攪拌することにより、該ゲルの第1級水酸基に親水性オキシラン化合物あるいはそのオリゴマーを付加反応により結合されるものである。

このとき所望により残留するオキシラン環を水和させるためおよび他の加水分解可能な基を加水分解させるために反応の最終段階において過剰の水を添加して50℃上において数時間加熱する。

特に、オキシラン化合物としてエピクロルヒドリンを使用する場合には、塩素原子を水酸基に変化させるためにアルカリ性水溶液による処理が重

要である。

上記の親水化処理を行う方法としては種々の方法を用いることができるが、以下に代表的な3つの方法を示す。

第1の方法は、アルカリ水溶液の存在下で反応させる方法であり、アルカリとしては、アルカリ金属の水酸化物および炭酸塩、アルカリ土類金属の水酸化物および炭酸塩が通常使用される。

第2の方法は極性有機溶媒中で触媒としてアルカリ金属の水酸化物および炭酸塩、あるいは金属アルコラートを添加して反応させる方法である。

極性有機溶媒としては、(1)ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドンなどアミド系の溶媒、(2)ジメチルスルホキシド、(3)ジオキサン、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどのエーテル系溶媒などが好ましい溶媒である。

第3の方法は触媒としてルイス酸の存在下で反応させる方法であり、弗化硼素およびそのエーテルコンプレックス、四塩化スズなどを代表的触媒として示すことができる。第3の方法において好ましい溶媒はエーテル系の溶媒、すなわちジオキサン、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどである。

本発明における親水性オキシラン化合物とはエピクロルヒドリン、グリシドール、ブタジエン、ジエポキシドおよび種々の多価アルコール類のグリシジルエーテル類などであり、多価アルコールのグリシジルエーテル類としては

- (1) エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタンジオール、ヘキサジオールなどのモノおよびジグリシジルエーテル類
- (2) グリセリン、エリスリトール、ペンタエリスリトール、ソルビトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパンなどのモノ、ジ、およびトリグリシジルエーテル類
- (3) ジエチレングリコール、トリエチレングリコールなどのポリエチレングリコール類のモノおよびジグリシジルエーテル類
- (4) プロピレングリコール類のモノおよびジグリシジルエーテル類
- (5) 単糖類およびオリゴ糖類のモノおよびポリグリシジルエーテル類

などを挙げることができる。

これらのグリシジルエーテル類は相当する多価

アルコールとエピクロルヒドリンを原料として公知の方法で合成することができ、代表的なものは商業規模で生産し販売されている。

以上示したオキシラン化合物はもちろん混合物であつても何等問題はない。

オキシラン化合物の分子量はあまり大きくなるとゲルの細孔容積を大幅に減少させることになり分離担体としての分離能を減少させるので通常1000以下、好ましくは500以下であることが望ましい。

本発明においてモノオキシラン化合物をもちいる場合には先に述べた親水化処理の効果のうち(1)の吸着性の低減効果のみが得られ、ジおよびトリオキシラン化合物を用いる場合には吸着性の低減の効果とともに架橋による機械的強度の増大効果も得ることができる。

本発明におけるペンタエリスリトールジメタクリレート単独水性懸濁重合またはペンタエリスリトールジメタクリレートと親水性基および/または親水性基に変性し得る基を有するメタクリレートモノマーとの水性懸濁共重合により得られる多孔性球状ゲルで、かつ、ゲルの細孔表面に第1級水酸基を有する親水性分離担体、該分離担体をアルカリ水溶液中でケン化して得られる親水性分離担体、上記分離担体の第1級水酸基に親水性オキシラン化合物あるいはそのオリゴマーを付加反応により結合した親水性分離担体の粒子径は1~500 μ 、特に5~200 μ のものが最も利用価値が大である。また、本発明のゲルの平均孔径は10 \AA ~2000 \AA の範囲でコントロールすることができ特に液体クロマトグラフィー用担体としては20 \AA ~1500 \AA の範囲のものが重要である。

本発明で得られる親水性分離担体のうち、親水化処理を行つた分離担体は低吸着性で機械的強度も大きく、特にゲル透過用担体としてきわめて優れたものであり、従来デキストランゲルやアガロースゲルが利用されてきた分野、特に、たんばく質や酵素などの生化学物質の分離、分析用を使用することができる。また親水化処理を行つたゲルも行なわないゲルも分配クロマトグラフィー用担体としてもきわめて優れた性能を有するものである。また両ゲルとも反応性の高い水酸基を有するためこれを基点としてデキストランゲルやアガロースゲルと同様に種々のより高次の機能を有する

ゲルを製造し利用することが可能であり、しかもどのような利用においてもデキストランゲルやアガロースゲルでは得られない機械的強度を有するという大きな利点がある。

以下、本発明を実施例により説明する。

参考例

(ペンタエリスリトールジメタクリレートの製造)

攪拌および温度調節機付きのガラス製フラスコにペンタエリスリトール200部、ジメチルホルムアミド1000部、水酸化カリウム2部を仕込み、65℃で攪拌しながらグリシジルメタクリレート400部を1時間で滴下した。同一温度で40分間攪拌を続けた後、氷酢酸1.5部を添加し60℃以下に冷却したのちロータリーエバポレーターで減圧下に溶媒のジメチルホルムアミドおよび未反応のグリシジルメタクリレートを留去した。残渣に酢酸エチル3000部を加えてよく混合したのち不溶物を分別した。

15%の食塩水1000部で酢酸エチル溶液を3回抽出し、水溶性成分を除き酢酸エチル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥したのち減圧下で酢酸エチルを留去した。得られたペンタエリスリトールジメタクリレートを高速液体クロマトグラフィーで下記の測定条件で分析した結果を第1図に示す。

装置：HLC802UR（東洋曹達工業社製）

カラム：TSKGEL G-2000H₈

内径7.5mm×長さ600mm×2本

溶離液：テトラヒドロフラン

流速：1 ml/min

測定温度：室温

検出器：示差屈折計

不純物として微量のグリシジルメタクリレートと約40%のペンタエリスリトールトリメタクリレートが含まれていた。

さらに、その赤外吸収スペクトルを測定した。その結果を第2図に示す。

以下実施例においては該方法で合成したペンタエリスリトールジメタクリレートをを用いた。

実施例 1

攪拌機および温度調節機を備えた重合反応器に水4000部、ポバール200部を仕込み、かきまぜつつ70℃に加熱し、ポバールを溶解させたのち、該ポバール水溶液にペンタエリスリトールジメタク

リレート400部、n-ブタノール800部、過酸化ベンゾイル8部を予じめ混合した溶液を添加し、16時間架橋重合を行った。

反応後、得られた懸濁物をガラスフィルター上にとり熱水でよく洗滌し、さらにアセトンでよく洗滌して微小球状ゲルを得た。

乾燥後のゲルの赤外吸収スペクトルを第3図に示す。

ゲルを分級し、8μ~12μのものを集め、内径7.5mm、長さ60cmのステンレス製カラムに高圧充填し、デキストラン標準試料（フアーマシア社製）で測定した結果、排除限界分子量は約10⁶であつた。測定条件を以下に示す。

装置：HLC802UR（東洋曹達工業社製）

溶媒：蒸留水

流速：10ml/min

試料注入量：0.4%溶液100μℓ

検出：RIディテクター

温度：室温

測定流速を変えて圧力損失との関係を測定した結果300kg/cm²まで圧力損失は流速と比例して増加し、得られたゲルの機械的強度はきわめて優れているものであつた。

ついで同じく水溶媒でポリエチレングリコール標準試料を測定した結果、分子量の大きい順に溶出せず、吸着性があることがわかつたが、従来の親水性担体に較べては優れていた。

さらに、溶媒をリン酸緩衝液に変えてたんぱく質標準試料について測定を行ったところ以下に示すような結果を得た。

	たんぱく質	溶出量 %
γ-グロブリン		15
アルブミン（人血清）		55
β-ラクトグロブリン		30
ミオグロビン		35
チトクロムC		3

それぞれの測定条件を以下に示す。

ポリエチレングリコール標準試料の測定条件

装置：HLC802UR

カラム：内径7.2mm×長さ600mm

溶離液：水

流速：1 ml/min

測定温度：室温

検出器：示差屈折計

たんぱく質標準試料の測定条件

装置：HLC802UR

カラム：内径7.5mm×長さ600mm 2本

溶離液：リン酸緩衝液 (pH6.8)

流速：1.0ml/min

測定温度：室温

検出器：UV 280nm

以下の実施例においてデキストラ、ポリエチレングリコールおよびたんぱく質の標準試料の測定条件はそれぞれ上記の条件で行なう。

実施例 2

架橋剤としてペンタエリスリトールジメタクリレート200部と共重合用モノマーとして、2-ヒドロキシエチルメタクリレート200部をもちいることのほかは実施例1と同様に懸濁重合および後処理を行つた。

分級して20 μ ～30 μ のゲルを集め実施例1と同様にカラムに充填しデキストラン標準試料により測定した結果、排除限界分子量は約10⁶であつた。

リン酸緩衝液をもちいて、たんぱく質標準試料を測定した結果、実施例1で得られたゲルに較べて吸着性はやや小さかつた。

たんぱく質	溶出量 %
γ-グロブリン	30
アルブミン (人血清)	63
β-ラクトグロブリン	38
ミオグロビン	45
チトクロムC	12

実施例 3

架橋剤としてペンタエリスリトールジメタクリレート60部、共重合用モノマーとしてグリシジルメタクリレート340部をもちい溶媒として、n-ブタノールの代りにモノクロルベンゼン600部をもちいるほかは実施例1と同様に懸濁重合および後処理を行つた。

残存エポキシ基を定量した結果、理論量の63%が残っていることがわかつた。

分級により20～30 μ のゲルを集め、実施例1と同様にカラムに充填し、デキストラン標準試料により測定した結果、排除限界分子量は約10⁶であつた。

ついで、分級により集められた20～30 μ のゲル100部を1規定の苛性ソーダ水溶液500部に懸濁さ

せ30℃で20時間攪拌したのち得られたゲルを温水でよく洗滌した。残存エポキシ基は検出されなかつた。該ゲルをカラムに充填しリン酸緩衝液にてたんぱく質標準試料を測定した結果を以下に示す。

たんぱく質	溶出量 %
γ-グロブリン	35
アルブミン (人血清)	62
β-ラクトグロブリン	45
ミオグロビン	48
チトクロムC	28

実施例 4

架橋剤としてペンタエリスリトールジメタクリレート150部、共重合用モノマーとしてノナエチレングリコールジメタクリレート (平均分子量400のポリエチレングリコール混合物のジメタクリレート) 250部をもちいることの他は実施例1と同様に懸濁重合および後処理を行つた。

分級して20 μ ～30 μ のゲルを集め実施例1と同様にカラムに充填しデキストラン標準試料により測定した結果、排除限界分子量は約10⁶であつた。

リン酸緩衝液をもちいてたんぱく質標準試料を測定した結果を以下に示す。

たんぱく質	溶出量 %
γ-グロブリン	55
アルブミン (人血清)	84
β-ラクトグロブリン	60
ミオグロビン	68
チトクロムC	45

実施例 5

架橋剤としてペンタエリスリトールジメタクリレート50部、共重合用モノマーとしてグリセリンモノメタクリレートモノプロピオネート350部をもちい、溶媒としてイソアミルアルコール600部をもちいる他は実施例1と同様に懸濁重合および後処理を行つた。分級して30～50 μ のゲルを集めその100部を3規定の苛性ソーダ水溶液500部中に懸濁させ40℃で16時間攪拌した。ゲルを集めて温水でよく洗滌したのち、実施例1と同様にカラムに充填し、デキストラン標準試料で測定した結果、排除限界分子量は、約5×10⁶であつた。水溶液によるポリエチレングリコール標準試料の測定によると、試料は分子量の大きい順番に溶出し

良好な低吸着性を示した。リン酸緩衝液をもちいた標準たんぱく質の測定結果を以下に示す。

たんぱく質	溶出量 %
γ-グロブリン	76
アルブミン (人血清)	92
β-ラクトグロブリン	75
ミオグロビン	80
チトクロム C	55

実施例 6

実施例 1 で得られた 8~12μ のゲルの水スラリーをガラスフィルター上で吸引濾過して得られた水湿潤ケーキ 100 部とグリセロールジグリシジルエーテル (長瀬産業株式会社製デナコール EX-314) 50 部および 1 規定の苛性ソーダ水溶液 200 部をガラス容器に仕込み、30°C にて 16 時間攪拌した。懸濁物をガラスフィルター上にて分別し温水でよく洗滌した。

得られたゲルの赤外吸収スペクトルを第 4 図に示した。1100cm⁻¹ 付近の増大が認められこれはエーテル結合によるものである。

該ゲルを実施例 1 と同様にカラムに充填しデキストラン、ポリエチレングリコール、およびたんぱく質の標準試料の測定を行つた。

水溶媒によるデキストランの測定により排除限界分子量は実施例 1 のゲルとほとんど変化は無かつた。水溶媒によるポリエチレングリコールの測定においては分子量の大きい順番に溶出し、親水化処理前のゲルに較べて吸着性の著しい減少が認められた。

リン酸緩衝液によるたんぱく質の測定においても吸着することなく分子量の順番に溶出し注入された試料の全量が回収された。第 5 図にポリエチレングリコール標準試料の測定例を示し、第 6 図にたんぱく質の標準試料の測定例を示した。

実施例 7

実施例 1 で得られた 8~12μ のゲルをジオキサンの十分洗滌し、ジオキサンで湿潤したケーキ 100 部、ジオキサン 600 部、エチレングリコールモノグリシジルエーテル 50 部、弗化硼素エーテラート 1 部をガラス容器に仕込み、70°C にて 16 時間攪拌した。

反応後ガラスフィルター上で温水によりよく洗滌し、カラムに充填して測定を行つた結果、実施例 6 とほとんど同様排除限界分子量が得られ、ポ

リエチレングリコールおよびたんぱく質標準試料に対するゲルの吸着性が著しく改良されていることがわかつた。

実施例 8

実施例 1 で得られた 8~12μ のゲルをジメチルホルムアミドで十分洗滌し、ジメチルホルムアミド湿潤ケーキ 100 部、ジメチルホルムアミド 300 部、グリセロールジグリシジルエーテル (デナコール EX314) 30 部、炭酸カリウム 2 部をガラス容器中で 60°C にて 16 時間攪拌したのち、1 規定の苛性ソーダ水溶液を 100cc 添加してさらに 10 時間反応を行つた。

反応後ガラスフィルター上で温水によりよく洗滌し、カラムに充填して、リン酸緩衝液をもちいてたんぱく質標準試料を測定した結果、分子量の大きい順番にすべてのたんぱく質が全量溶出した。

実施例 9

実施例 2 で得られた 20~30μ のゲルの水湿潤ケーキ 100 部、1 規定の苛性ソーダ水溶液 200 部、ブタジエンジエポキシド 40 部をガラス容器中で 25°C にて 10 時間攪拌し、さらに 50°C に昇温して 2 時間攪拌した。反応後ゲルを常法により処理し、カラムに充填してリン酸緩衝液によりたんぱく質標準試料を測定した結果、いずれも吸着することなく、全量溶出した。

実施例 2 で得られた結果と較べて著しい吸着性の減少が認められ、本実施例の親水化処理による効果が大きいことがわかる。

実施例 10

実施例 3 で得られた 15~20μ のエポキシ基残存ゲルの水湿潤ケーキ 100 部、1 規定の苛性ソーダ水溶液 200 部、エチレングリコールジグリシジルエーテル (デナコール EX-811) 50 部をガラス容器中で 30°C にて 20 時間反応させたのち、50°C に加温してさらに 5 時間反応を行つた。

得られたゲルをよく洗滌したのちカラムに充填した。

ポリエチレングリコールおよびたんぱく質標準試料をもちいて測定した結果いずれも分子量の順番に全量が溶出した。

なお、実施例 3 の結果と較べて本実施例における親水化処理がゲルの機械的強度の向上、および吸着性の低域に大きな効果を有することがわかつた。

た。

実施例 11

実施例 4 で得られた $20\mu\sim 30\mu$ のゲルをもちいる他は実施例 7 と同様に親水化処理および後処理を行い、得られたゲルを充填してリン酸緩衝液によりたんぱく質標準試料の測定を行なった結果、すべてのたんぱく質が吸着されることなく溶出した。実施例 4 の結果と較べて本実施例の親水化処理の大きな効果が認められる。

実施例 12

実施例 1 で得られた $8\sim 12\mu$ のゲルをもちいオキシラン化合物として、エピクロルヒドリン 50 部をもちいる他は実施例 7 と同様に反応を行なった。得られたゲルを温水で洗滌し 1 部のゲルを乾燥して元素分析により塩素原子の含量を求めたところ 8 % の塩素原子が検出された。残りのゲルを 1 規定の苛性ソーダ水溶液 300 ml 中に懸濁させ 60°C にて 10 時間攪拌し塩素原子の加水分解反応を行なった。ゲルを温水で洗滌し 1 部を乾燥し元素分析を行って塩素原子の含量を測定した結果 0.5 % であつた。

得られたゲルをカラムに充填し、リン酸緩衝液をもちいてたんぱく質標準試料を測定した結果いずれも吸着されることなく、分子量の大きい順に全量溶出した。実施例 1 の結果と較べ本実施例における親水化処理が極めて有効であることがわかる。

実施例 13

実施例 5 において得られたゲルを分級して $15\sim 20\mu$ のゲルを集め、その水湿润ケーキ 100 部を 3 規定の苛性ソーダ水溶液 500 部中に懸濁させ、 40°C で 16 時間ケン化反応を行なった。

得られたゲルを温水で洗滌したのち、グリセロールジグリシジルエーテル（デナコール EX-314）50 部、1 規定苛性ソーダ水溶液 200 部とともに 30°C にて 16 時間攪拌し親水化処理を行なった。

得られたゲルを温水で洗滌し、高圧下でカラム

に充填したところ十分な機械的強度を有し容易に充填することができた。実施例 5 に示したように親水化処理前のゲルは軟かく充填が困難であつたのに較べ、親水化処理による機械的強度の増加が顕著である。

リン酸緩衝液をもちいてたんぱく質の測定を行なったところすべて吸着することなく溶出し、吸着性も親水化処理前に較べて改良されていることがわかつた。

10 図面の簡単な説明

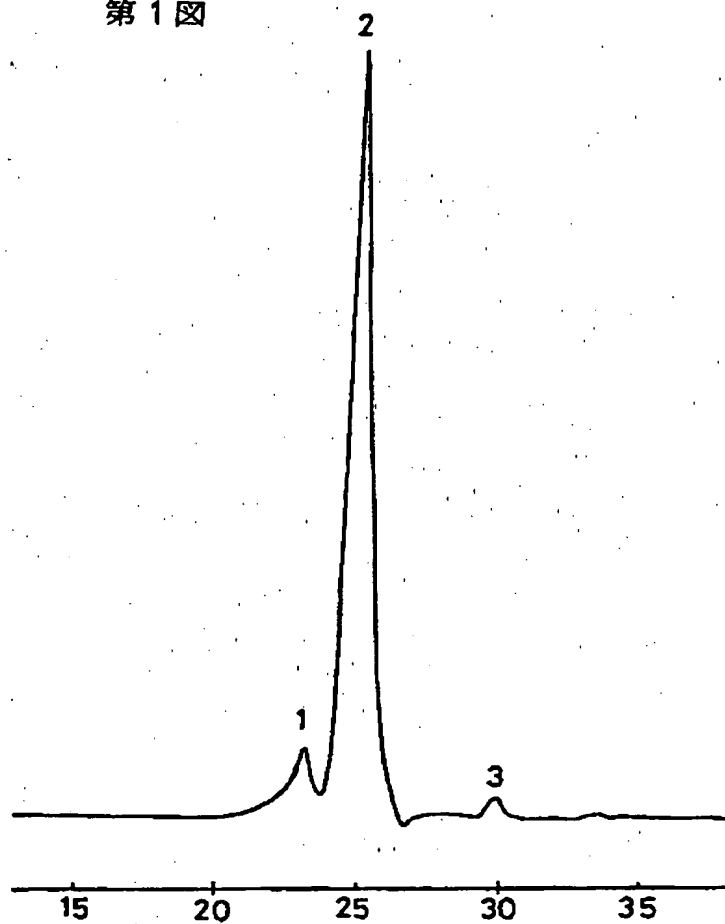
第 1 図は、参考例で示した方法により合成されたペンタエリスリトールジメタクリレートの高速度液体クロマトグラフィーによる分析結果である。第 2 図は、参考例で示した方法により合成されたペンタエリスリトールジメタクリレートの赤外線吸収スペクトルである。第 3 図は、実施例 1 で得られた多孔性球状ゲルの赤外線吸収スペクトルである。第 4 図は、実施例 6 で得られた多孔性球状ゲルの赤外線吸収スペクトルである。第 5 図は、実施例 6 で得られた多孔性球状ゲルをカラムに充填してポリエチレングリコール（PEG）標準試料混合物を測定した結果である。第 6 図は、実施例 6 で得られた多孔性球状ゲルをカラムに充填してたんぱく質標準試料を測定した結果である。分子量の大きい順番に溶出しており、吸着性がないことを示している。

1 ……ペンタエリスリトールトリメタクリレート、2 ……ペンタエリスリトールジメタクリレート、3 ……グリシジルメタクリレート、4 ……ポリエチレングリコール 20000、5 ……ポリエチレングリコール 6000、6 ……ポリエチレングリコール 4000、7 ……ポリエチレングリコール 1000、8 ……ポリエチレングリコール 600、9 ……ポリエチレングリコール 200、10 ……γ-グロブリン、11 ……アルブミン（人血清）、12 ……β-ラクトグロブリン、13 ……ミオグロビン、14 ……チトクロム C。

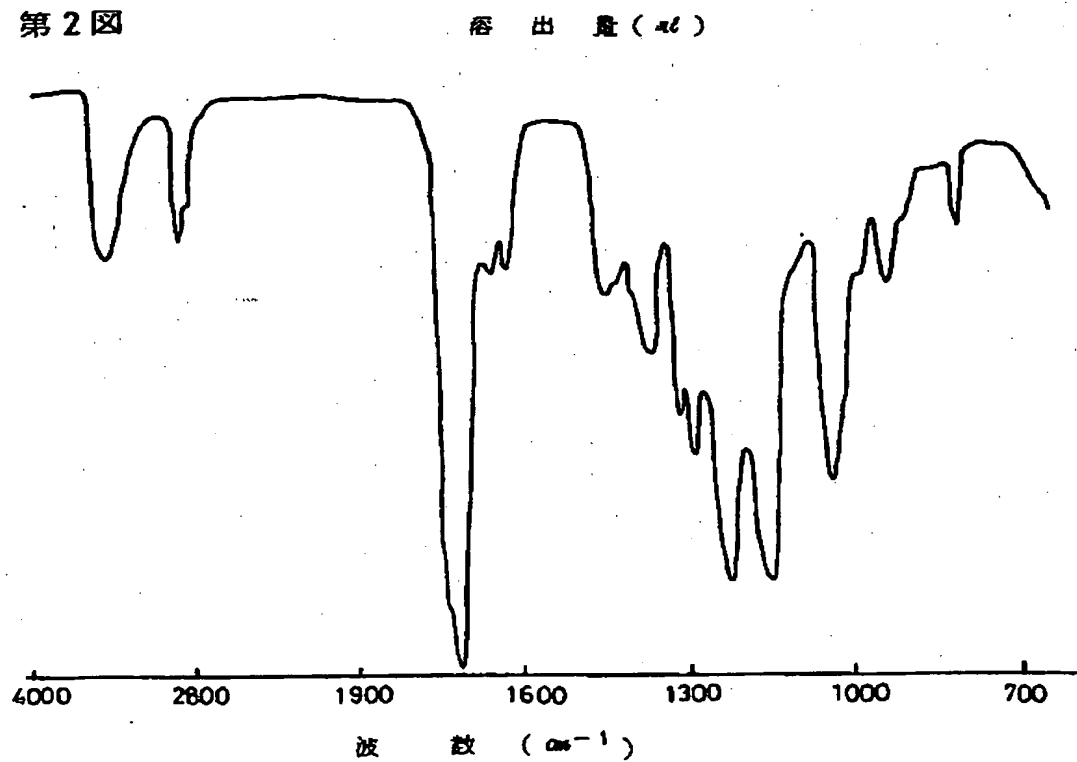
(10)
(10)

特公 昭 61-36177

第 1 図



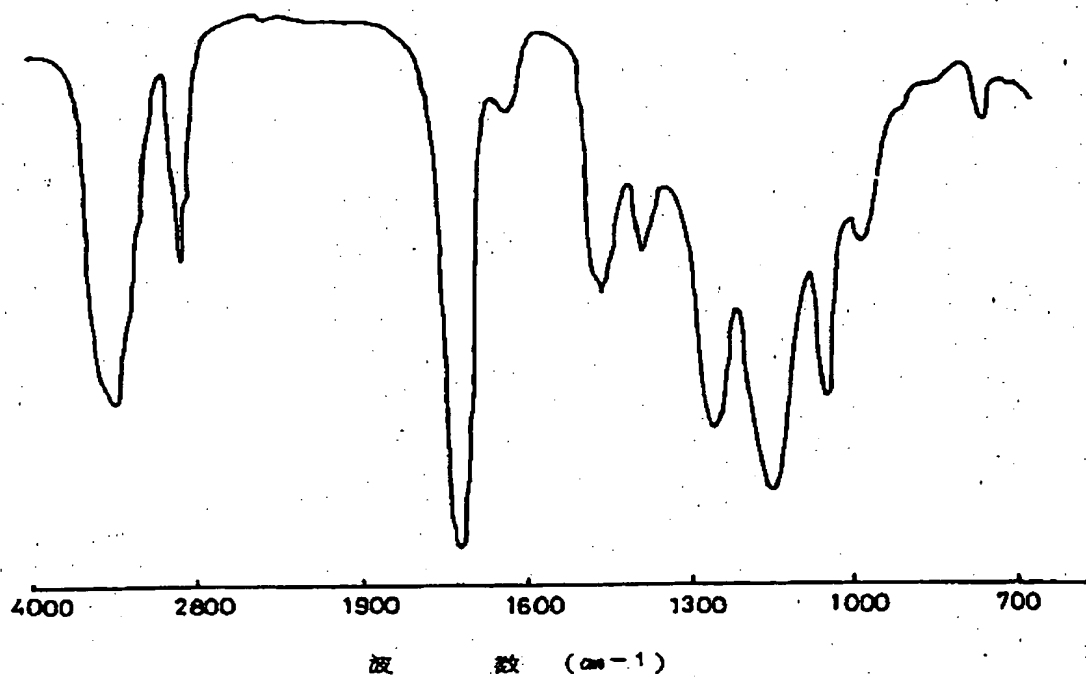
第 2 図



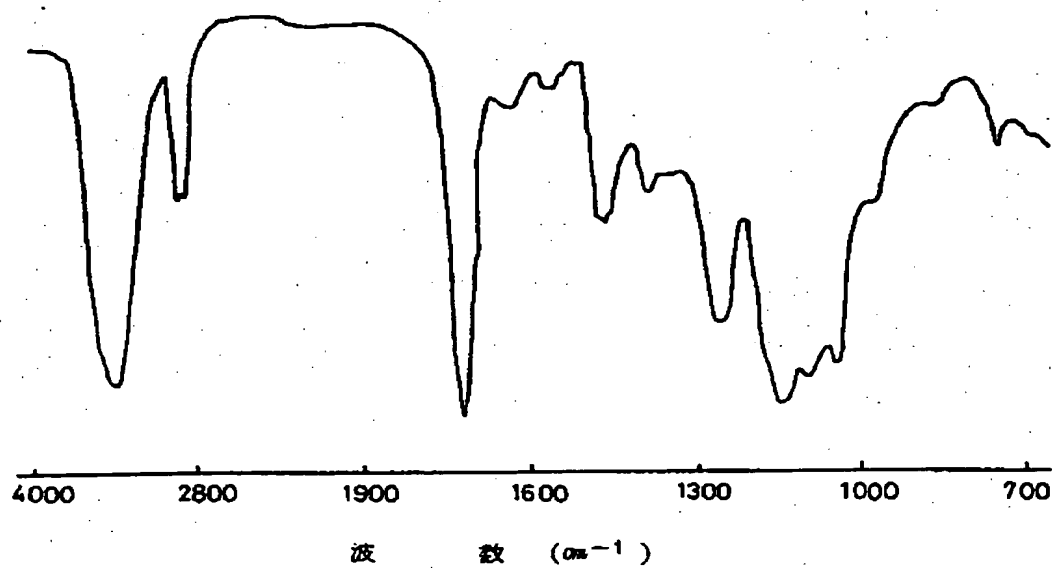
(11)
(11)

特公 昭 61-36177

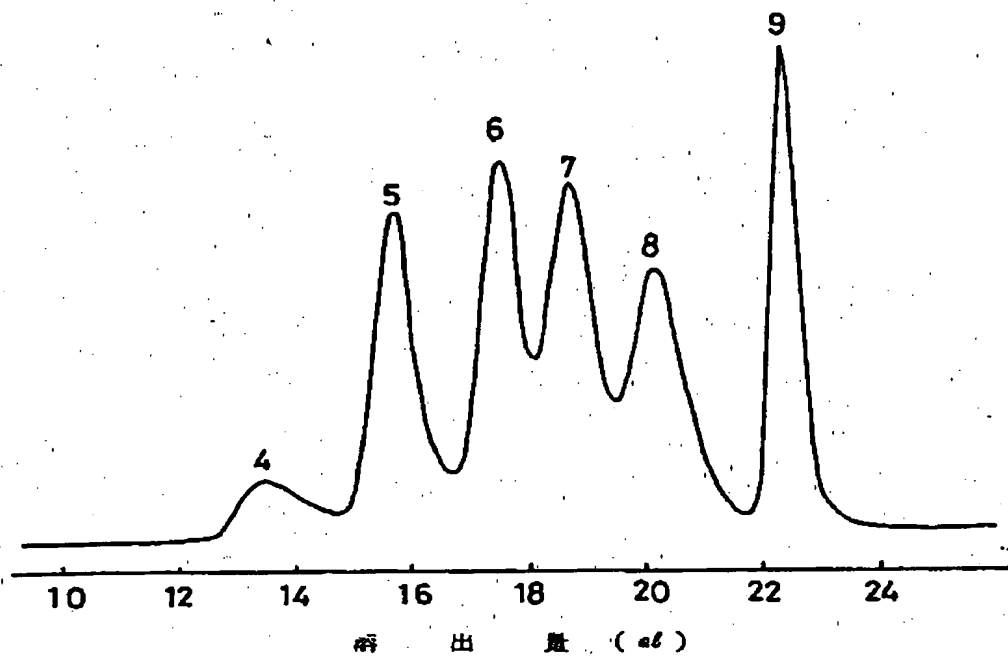
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

